

1967

Über das Vorkommen von atypischen Salmonellastämmen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhild Gschrey
aus München

1967

9199

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Über das Vorkommen
von atypischen Salmonellastämmen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhild Gschrey
aus München

1967

Dekan: Professor Dr. med. F. Lembeck
Berichterstatter: Professor Dr. med. R. -E. Bader

INHALT

	Seite
I. Einleitung	1
II. Eigene Untersuchungen	
A) Material	7
B) Methode	10
III. Ergebnisse	14
IV. Diskussion	25
V. Zusammenfassung	29
VI. Literatur	30

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

SALMON beschrieb 1885 in einem Artikel "Investigations in swine-plague" ein Bacterium, das er für den Erreger dieser Krankheit hielt, wie folgt: "Es ist ein bewegliches Bacterium, das hauptsächlich paarweise gefunden wird. Jedes Individuum erscheint als verlängertes Oval, das ungefähr doppelt so lang wie breit ist. Die Länge beträgt 1,2 - 1,5 μ . Es wird leicht durch Anilinfarben gefärbt. Es wächst bereitwillig in neutralen, leicht alkalischen oder sauren Fleischbrühen, mit oder ohne Peptone. Langsamer wächst es in Nährgelatine, die es nicht verflüssigt. Es hat nicht den geringsten fauligen Geruch. In Milch, die durch diskontinuierliches Kochen sterilisiert wurde, vermehrt sich das Bacterium, ohne die Milch zu verändern. Auf gekochten Kartoffeln wächst es sehr gut. Die Schnittfläche wird an der Impfstelle zunächst schokoladenbraun, dann stufenweise dunkler und breitet sich langsam über die ganze Oberfläche aus. Das Bacterium ändert seine Größe etwas, wenn es in verschiedenen Medien kultiviert wird. In flüssigen Kulturen, die 10 Minuten lang einer Temperatur von 58° C ausgesetzt sind, wird es abgetötet. Sporen werden wahrscheinlich nicht gebildet."

Damit hatte SALMON ein Bacterium beschrieben, das mit vielen anderen später entdeckten Bakterien die nach ihm benannte Gattung Salmonellen bildet.

Die Untersuchungsmethoden haben sich seither verfeinert, zur kulturell-biochemischen Prüfung sind serologische Methoden getreten, durch die sich die Antigenformeln der einzelnen Typen erkennen und unterscheiden lassen. 1934 wurde zum erstenmal von dem Internationalen Salmonellasubkomitee folgende Definition aufgestellt: "Salmonellabazillen sind gramnegative, sporen- und kapsellose, meist bewegliche Stäbchen, die auf den üblichen Nährböden wachsen, die stets Dextrose mit oder ohne Gasbildung spalten, die dagegen Adonit, Lactose und Saccharose bei 30-tägiger Bebrütung bei 37° C nicht angreifen, die Gelatine nicht verflüssigen, die kein Indol bilden und Antigene der Salmonellagruppe enthalten."

Die damaligen Kenntnisse über das biochemische und serologische Verhalten von Salmonellen ließen eine exaktere Definition noch nicht zu. Die Weiterentwicklung der Forschung in der Bakteriologie brachte tieferen Einblick in die Vergärungsweise und die Antigenstruktur. Dies veranlaßte BADER 1949, eine neue

Definition vorzuschlagen: "Die Gattung *Salmonella* umfaßt Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae*, die Lactose, Saccharose und Salizin nicht spalten, die Milch nicht zur Gerinnung bringen, Gelatine nicht verflüssigen und kein Indol bilden, die Dextrose unter Gasbildung vergären und sich auf Grund ihres Antigenaufbaues in das Kauffmann-White-Schema eingliedern lassen. Außerdem können in die Gattung *Salmonella* Angehörige der Familie *Enterobacteraceae* aufgenommen werden, die sich in einer der oben genannten Eigenschaften abweichend verhalten. Der Standort der *Salmonellen* ist der Darm von Mensch und Tier."

Diese Definition zeigt, daß es nicht immer leicht ist, über die Zugehörigkeit eines Stammes zur *Salmonellagruppe* zu entscheiden. Denn die Natur läßt sich nun einmal nicht in die von Menschen festgelegten Schemata einengen. Daher "muß die *Salmonelladefinition* wie jede andere Gruppendifinition in der Bakteriologie ein gewisses Moment der Willkür enthalten, da es in der Natur keine scharf abgegrenzte *Salmonellagruppe* gibt, so daß wir nur die Wahl zwischen einer unscharfen Definition und dem Verzicht auf jede Definition überhaupt haben" (KAUFFMANN 1938).

Im Rahmen dieser Definition gibt es eine Reihe von morphologischen Abweichungen, deren Kenntnis für die praktische Diagnostik von Bedeutung ist. ARKWRIGHT schilderte 1921 eine Wuchsform, die sich von der erhabenen wachsenden, scharfrandig begrenzten Kolonie der S-Form mit spiegelnder Oberfläche dadurch unterscheidet, daß ihre Kolonien flach und zackig umrandet sind und ihre Oberfläche samtartig matt erscheint. Er bezeichnete sie als "Rauhform". v. PRITTWITZ und GAFFRON (1952) hat diese Kolonien durch das Phasenkontrastmikroskop in ihrem Wachstum verfolgt. Es gelang ihr nicht, "aus dem Aussehen und der Lagerung der einzelnen Stäbchen bereits junge Kulturen gramnegativer Darmbakterien auf festen Nährböden der Rauh- und Glattform des betreffenden Stammes zuzuordnen. Nur bei Betrachtung der Kolonien mit schwächeren Vergrößerungen ergaben sich auffällige Änderungen im Stäbchengroßverband der Kolonien die bereits makroskopisch typische Merkmale aufwiesen." KRÖGER (1955) folgerte daraus, daß der morphologische Unterschied zwischen S- und R-Formen kein "Individualsymptom, sondern ein Gruppen- oder Gemeinschaftskriterium ist."

SONNENSCHN (1926) hat auf die Bedeutung einer atypischen Wuchsform bei *Salmonella paratyphi B* aufmerksam gemacht, die er "Mukosusform" nennt. Durch Züchtung in Galle konnte sie in die zugehörige, nicht schleimige, meist agglutinable Form übergeführt werden. HABS und BLAU (1933) beschrieben diese Variante, die sie aus dem Gallenblaseninhalte eines Dauerausscheiders züchten konnten, als eine bei 37° C nach Art eines Schleimtropfens wachsende Form.

Als weitere morphologische Abart beobachteten sie das Auftreten von sogenannten Zwergkolonien, die in Form sehr kleiner "Knöpfchen" wuchsen. In ihrer Oberflächengestaltung gleichen sie oft der Rauhform.

BADER (1949) beschrieb eine Variantenbildung bei *Salmonella paratyphi* B var. java, die auftrat, als eine mehrere Jahre verschlossene Testkultur abgeimpft wurde. Nach 24stündiger Bebrütung entwickelten sich neben den normalen Glattformen auch solche, auf deren Oberfläche sich nach einiger Zeit ein "Netz von verschlungenen Balken" zeigte, das wie ein Weidengeflecht aussah. Dabei trockneten die Kolonien aus und ließen sich als "zähes Häutchen ... abheben."

Schwerwiegender sind Abweichungen bestimmter biochemischer Merkmale, weil sie der Definition des Salmonellasubkomitees 1934 widersprechen. So wurde z.B. von KAUFFMANN (1937) eine lactosespaltende Variante von *Salmonella anatum* gefunden. Serologisch verhielt sie sich wie die Ausgangskultur, d.h. sie lag in der spezifischen und unspezifischen Phase vor. Gleichzeitig spaltete diese Variante Salizin schnell und bildete kein Gas aus Dextrose.

Desgleichen sind durch KRISTENSEN und KAUFFMANN (1936) indolpositive Varianten von *Salmonella eastbourne* bekannt. Die Stärke der Indolbildung verhielt sich sehr schwankend. Es gelang wiederholt, völlig indolnegative Varianten zu isolieren. Auch ein Stamm von *Salmonella abortus bovis* wurde beschrieben (KAUFFMANN 1941), der Gelatine verflüssigen konnte.

WATANABE, WILSON und WAMPOLE (1961) isolierten eine Salmonelle, die sich serologisch als *Salmonella enteritidis* bestimmen ließ. Ihre Vergärungsweise entsprach der von *Salmonella enteritidis*, mit der einen Ausnahme, daß sie Saccharose prompt zu spalten vermochte. Reinheitsprüfungen konnten den Verdacht ausschließen, daß zusätzliche Bakterien den Zucker spalteten.

WUNDT (1953) fand eine Variante von *Salmonella paratyphi* B, deren Kenntnis für die Praxis sehr wertvoll ist. Aus dem Stuhl einer Dauerausscheiderin isolierte er gramnegative, sporenlose Stäbchen, die Dextrose unter Gasbildung spalteten, Lactose nicht angriffen und auf dem Kligler'schen Eisenagar kein H_2S bildeten. Solche Stämme werden üblicherweise zur Gattung *Paracolonobacterium* gezählt (BORMANN, WHEELER und STUART 1944, BERGEY 1957) und diagnostisch nicht weiter verfolgt, da *Salmonella paratyphi* A und C, die ebenfalls kein H_2S bilden, in unseren Breiten höchst selten sind. WUNDT konnte jedoch mit serologischen Methoden zeigen, daß es sich um eine H_2S -negative Variante von *Salmonella paratyphi* B handelte.

Da die übrigen Eigenschaften aller genannten Stämme der Definition der Sal-

monellen entsprachen, wurden sie als Varianten in diese Gruppe aufgenommen.

Auch auf serologischem Gebiet ist mit atypisch reagierenden Stämmen zu rechnen. Wieder sind es vor allem die Rauhestämme, die sich anders verhalten als die Glattformen, da sie bereits in physiologischer und 3,5 %iger NaCl-Lösung Spontanagglutination zeigen. Dieses Phänomen macht eine serologische Bestimmung der Körper- und Geisselantigene unmöglich, da eine spezifische Agglutination durch die unspezifische überlagert wird. Viele Autoren haben sich mit dem Problem der R-Stämme befaßt (BRAUN 1947, SCHMIDT 1955, KRÖGER 1957, LÜDERITZ, KAUFFMANN, STIERLIN und WESTPHAL 1960). Bei der Erforschung der Zellwand von Enterobacteraceen haben LÜDERITZ und WESTPHAL (1966) und LÜDERITZ, STAUB und WESTPHAL (1966) auch die Entstehung und Struktur der R-Formen beleuchtet. Der cytoplasmatischen Membran sitzt nach außen zunächst eine Schicht mit rigider Struktur auf. Dieser folgt eine Schicht aus Proteinen und Lipiden, an welche kammförmig strukturierte Polysaccharidmoleküle gebunden sind. Diese komplexen Polysaccharide können aus 5 - 8 verschiedenen Monosacchariden zusammengesetzt sein. Bei den O- und R-Antigenen sämtlicher Salmonellapolysaccharide findet man ein Kernpolysaccharid, welches aus 5 Zuckern, den sogenannten Kernpolysacchariden, besteht, nämlich Heptose, Ketodesoxyoktensäure, D-Glucose, D-Galaktose und D-Glucosamine. Bei S-Formen finden sich zusätzlich weitere Zucker, die in spezifischen Ketten dem Kernpolysaccharid anhaften. Sie sind für die Spezifität jedes einzelnen O-Antigens charakteristisch. Daher sind auch Polysaccharide aus R-Formen chemisch sehr einförmig, gleichgültig von welchem Serotyp sie sich ableiten. Die Seitenketten mit den spezifischen Zuckern fehlen ihnen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der serologischen Uniformität. Die R-Mutanten werden auf Defekte in der Enzymausstattung zurückgeführt, die zur Bildung der spezifischen Seitenketten nötig ist. Einen Beweis für diese Hypothese sehen die Autoren in folgendem Versuch: Setzt man dem Kulturmedium den fehlenden Zucker zu, so wird der Enzymdefekt übergangen und es entsteht das komplette Polysaccharid der Glattform. Bei *Salmonella typhimurium* z.B. enthielten Säurehydrolysate von Zellwänden der S-Form die Zuckerbausteine Abequose und Rhamnose, die bei den R-Formen völlig fehlten (HERZBERG und GREEN 1964). Die O- und R-Antigene bilden die äußere Hülle der Bakterienwand (SHANDS 1965). Hochverzweigte Polysaccharide sind fähig, sehr viel Wasser zu binden, und sind verantwortlich für die Stabilität und den Umfang der Wasserschicht um die Bakterienzelle. Für die Rauhestämme ist diese Kapazität relativ gering, was LÜDERITZ, STAUB und WESTPHAL (1966) als mögliche Erklärung für die Neigung zur Spontanagglutination ansehen.

Als T-Formen bezeichnete KAUFFMANN (1956) morphologische Glattformen,

die in Absorptionsversuchen O-Antikörper nicht binden konnten. R-Formen können T-Antigen enthalten, T-Formen spalten R-Formen ab. LÜDERITZ und WESTPHAL (1966) untersuchten diese Formen chemisch. Sie konnten feststellen, daß auch die T-Formen nicht die spezifischen Zucker der Seitenketten enthalten. Doch im Gegensatz zu den R-Formen sind sie keine Verlustmutanten, sondern haben in ihrem Lipopolysaccharid zu den basalen Zuckern noch zusätzlich eine große Menge Ribose und Galaktose, die weder bei der S-Form noch bei der R-Form vorhanden ist.

Diese Beispiele sollen zeigen, daß das Vorkommen von atypischen Stämmen nicht nur theoretisch erwogen werden muß. Durch sie werden in der Untersuchungstechnik immer neue Probleme gestellt.

Im Hygiene-Institut der Universität Tübingen tauchten bei Untersuchungen Stämme auf, die sich mit den üblichen Methoden nicht differenzieren ließen. Sie sollen hier beschrieben werden:

I. Bei einer Untersuchung auf Grund des Bundesseuchengesetzes, veranlaßt vom Staatlichen Gesundheitsamt Tuttlingen, wurde der Stuhl von Frau M. L., geb. 1903, als salmonellenverdächtig in das Tübinger Hygiene-Institut eingesandt. Von der Bakterienträgerin sind keinerlei Krankheitserscheinungen bekannt. Die Züchtung der Erreger ergab einen Rauhstamm. Die Prüfung in verschiedenen H-Seren zeigte, abgesehen von der immer vorhandenen Spontanagglutination, Unterschiede einzelner Kolonien in der Stärke der Agglutination. Eine Kolonie und ihre Abimpfungen reagierten in Spuren mehr in gm-Serum, eine zweite stärker in d-Serum. So wurden diese Kolonien als Repräsentanten möglicherweise verschiedener Stämme angesehen und als Stamm 54700 gm und Stamm 54700 d weiter geführt.

Eine dritte Kolonie wurde auf Grund ihrer ausgeprägten Schleimwallbildung als Stamm 54700 Para B abgesondert. Bei einer zweiten Stuhluntersuchung konnte zusätzlich ein Stamm isoliert werden, der eindeutig als *Salmonella paratyphi B* zu identifizieren war. Er wurde als Stamm 190 L. weitergeführt.

II. Aus dem Stuhl einer seit drei Jahren anfallsweise an starken Oberbauchkoliken mit Durchfällen leidenden Ärztin wurde eine *Salmonelle* isoliert, die sich nach biochemischer und serologischer Untersuchung als *Salmonella muenchen* differenzieren ließ. Nach intensiven Behandlungsversuchen ergaben sich oft negative Kontrollen, bis sich ein zweiter Bakterienstamm fand, der sich serologisch nicht bestimmen ließ, da er rauh war. Dieses Phänomen konnte nicht beseitigt werden. Zur weiteren Untersuchung wurde der erste

Stamm mit der Nummer 338, der zweite mit der Nummer 3979 gekennzeichnet.

III. Stamm 394 konnte in einem auswärtigen Untersuchungslaboratorium nicht identifiziert werden. Bei der biochemischen Untersuchung verhielt er sich wie *Salmonella typhi*, d.h., er spaltete Dextrose im Kligler'schen Eisenagar ohne Gasbildung, griff Lactose nicht an und zeigte ringförmige H_2S -Bildung. Serologisch reagierte er bei der Objektträgeragglutination mit einem *Salmonellasammelserum* positiv. Als Geisselantigen wurde d bestimmt. Jedoch war es nicht möglich, O-Antigene der *Salmonella* D-Gruppe festzustellen.

Diese genannten, sich atypisch verhaltenden Stämme exakt zu diagnostizieren, war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) MATERIAL

Alle Stämme waren, bevor sie zur Untersuchung kamen, als StICKKULTUREN in Nähragar, luftdicht verschlossen, bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden.

1. Bouillon:

1% Liebig's Fleischextrakt, 1 % Pepton, 0,3 % NaCl, Aqua dest.

2. Nähragar:

Der Bouillon wurden 2,5 % Agar-Agar zugesetzt.

3. Blutagar:

Dem Nähragar wurden 10 % Hammelblut zugesetzt.

4. Endoagar:

1000 ml Nähragar, 15 g Lactose plus 30 ml Aqua dest. 5 ml alkoholische Fuchsinlösung, 25 ml von einer 10 %igen Natriumsulfitlösung.

5. Kligler'scher Eisenagar:

Bacto Kligler Iron Agar von Difco Laboratories, Detroit, USA. Zusammensetzung:
3 g Bacto-Beef Extract, 3 g Bacto-Yeast Extrakt, 15 g Bacto-Peptone, 5 g Protease-Peptone Difco, 10 g Bacto-Lactose, 1 g Bacto-Dextrose, 0,2 g Ferrous Sulfate, 5 g Sodium Chloride, 0,3 g Sodium Thiosulfate, 12 g Bacto-Agar, 0,024 g Bacto-Phenol-Red.

6. Kohlenhydratnährböden:

Als Grundlage wurde Bouillon verwendet, Indikator war Bromthymolblau, 0,1 n NaOH 25 ml, 475 ml Aqua dest. Von dieser Mischung 1,2 ml auf 100 ml Nährboden. Jedem Röhrchen wurde 0,5 % des jeweiligen Zuckers zugesetzt. Die Röhrchen wurden mit der Nadel von 24 Stunden bebrüteten Blutagarplatten aus beimpft und 28 Tage lang bei 37° C im Brutschrank beobachtet. Bei positiver Reaktion kam es zur Gelbfärbung des Nährmediums.

7. Ammonreihe:

5,0 g NaCl, 0,2 g Magnesiumsulfat, 1,0 g Ammoniumphosphat, 1,0 g sekun-

däres Kaliumphosphat, Aqua dest. auf 1000 ml, 4 ml Bromthymolblaulösung pro 100 ml Nährboden, 20 g gewässerter Agar, dazu jeweils 0,5 % Dextrose bzw. Arabinose, Rhamnose, Dulcit oder Natriumcitrat.

8. Nährgelatine:

Der Nährbouillon wurden 15 - 18 % pulverisierte Gelatine zugesetzt.

9. Indolprüfung:

1 l Wasser, 10 g Pepton, 5 g NaCl, 0,2 g Trypsin, 0,2 g primäres Kaliumphosphat, 0,02 g Magnesiumsulfat, 10 ml Toluol, 10 ml Chloroform. Nach Filtrieren Verdünnung mit physiologischer NaCl auf 1:4.

10. Nitratreduktion:

Der Nährbouillon wurde 0,1 % KNO_3 zugesetzt.

11. VOGES-PROSKAUER-Reaktion:

7 g Pepton, 5 g sekundäres Kaliumphosphat und 5 g Traubenzucker wurden in 1 l Aqua dest. gelöst, die Reaktion auf pH 7,0 eingestellt, abgefüllt und sterilisiert.

12. Methylrot-Reaktion:

Phosphat-Traubenzucker-Peptonlösung, siehe VOGES-PROSKAUER-Reaktion.

13. SIM-Nährmedium:

30 g Bacto-Peptone, 3,0 g Bacto-Beef Extrakt, 0,2 g peptonized Iron DIFCO, 0,025 g Sodium-Thiosulfat, 3 g Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA).

14. Harnstoffprüfung:

Nährbouillon plus 1 % Harnstoff.

15. Decarboxylierung von Aminosäuren durch Enterobacteriaceae:

5 g Bacto-Peptone, 3 g Bacto-Yeast-Extrakt, 1,0 g Bacto-Dextrose, 0,02 g Bacto-Brom-Cresol-Purpur, 5 g l-Lysin HCl bez. l-Arginin HCl, l-Ornithin HCl.

Lila = + (Spaltung der Aminosäuren, alkalisch)

Gelb = - (nur Spaltung der Dextrose, sauer).

16. KCN-Test:

10 g Witte-Pepton, 5 g NaCl, 0,225 g KH_2PO_4 , 5,64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Aqua dest. ad 1000; dazu 15 ml einer 0,5 %igen KCN-Lösung.

17. Schwärmagar:

15 ml Agar und 45 ml Bouillon wurden zuerst erhitzt, dann vermischt.

18. O-Seren:

Die Seren wurden durch Immunisieren von Kaninchen hergestellt.

- "IV" Serum S6, hergestellt mit *S. reading*, lebend injiziert, abgesättigt mit *S. typhi*.
- "V" Serum I 19a, hergestellt mit *S. paratyphi B*, lebend injiziert, abgesättigt mit *S. paratyphi B* var. *odense*.
- "VII" Serum T 70, hergestellt mit *S. thompson* var. *berlin*, nach 2 1/2 stündigem Kochen bei 100⁰ C in abgetöteter Form injiziert, abgesättigt mit *S. kottbus*.
- "VIII" Serum T 71, hergestellt mit *S. newport*, nach 2 1/2 stündigem Kochen bei 100⁰ C in abgetöteter Form injiziert, abgesättigt mit *S. thompson* var. *berlin*.
- VI, VII Serum T 70, siehe oben, nicht abgesättigt.
- VI, VIII Serum K 5, hergestellt vom Staatlichen Seruminstitut Kopenhagen.
- "IX" Serum T 29a hergestellt mit *S. typhi* O-Form, lebend injiziert, abgesättigt mit *S. reading* und *S. wichita*.

TPE-Sammelserum hergestellt vom Robert-Koch-Institut Berlin.

19. H-Seren:

- "2" Serum T 61a, hergestellt mit *S. paratyphi B* (hauptsächlich unspezifisch), nach Mäusepassage O, 25 %ige Formalin-NaCl-Behandlung, abgesättigt mit *S. thompson* var. *berlin*, *S. minnesota*, *S. paratyphi B* O-Form und *S. bredeney*.
- "5" Serum T 28, hergestellt mit *S. thompson* var. *berlin*, Formalin-NaCl-Aufschwemmung, abgesättigt mit *S. oranienburg*, *S. newport* var. *puerto rico* und *S. anatum*.
- "6" Serum aus K 49, hergestellt vom Staatlichen Seruminstitut Kopenhagen, abgesättigt mit *S. thompson* var. *berlin* und *S. muenster*.
- "7" Serum hergestellt mit *S. gaminara*, abgesättigt mit *S. paratyphi B*, *S. newport* var. *puerto rico* und *S. hvittingfoss*.
- "d" Serum T 31, hergestellt mit *S. virginia*, Formalin-NaCl-Aufschwemmung, abgesättigt mit *S. newport*.
- e, h Serum T 22, hergestellt mit *S. IV*, *V*, *XII*; eh, -; Formalin-NaCl-Aufschwemmung.
- "h" Serum T 22, hergestellt mit *S. IV*, *V*, *XII*; eh, -; siehe oben, abgesättigt mit *S. abony* und *S. abortus equi*.
- "i" Serum T 100, hergestellt mit *S. typhimurium*, Formalin-NaCl-Aufschwemmung, abgesättigt mit *S. paratyphi B*.
- "z₆" Serum aus Serum K 44, hergestellt vom Staatlichen Seruminstitut Kopenhagen, abgesättigt mit *S. thompson* var. *berlin* und *S. kentucky*.

- "z₁₀" Serum aus Serum K 45, hergestellt vom Staatlichen Seruminstitut
Kopenhagen, 1:50 verdünnt.
- "z₁₄" Serum aus Serum K 57, hergestellt vom Staatlichen Seruminstitut
Kopenhagen 1:100 verdünnt.

20. H-Sammelseren:

- HA: enthaltend die Faktoren a, b, c, d, i, z₁₀, z₁₂, z₁₄;
- HB: enthaltend die Faktoren e, f, g, h, m, ms, nx, p, q, s, t;
- HC: enthaltend die Faktoren k, l, r, v, w, y, z_a, z_d, z₄, z₆, z₂₃, z₂₄,
z₂₅;
- HD: enthaltend die Faktoren, 1, 2, 3, 5, 6, 7; z₆.

B) METHODE

1. Zur Haltung wurden alle Stämme auf Blutagar ausgesät und bei 37° C im Brutschrank gehalten. Jede Woche wurde auf frische Nährböden überimpft.
2. Die koloniemorphologische Beschaffenheit der zu untersuchenden Stämme wurde auf Blutagar und Endoagar bestimmt. Die Beurteilung erfolgte nach 24stündiger Bebrütung mittels Lupe.
3. Die Wuchsform in Fleischbouillon wurde nach 24 Stunden bei 37° C bestimmt.
4. Zur Prüfung der Schleimwallbildung wurde Nähragar mit der Nadel beimpft, 24 Stunden bei 37° C und mehrere Tage bei Zimmertemperatur bebrütet. Im positiven Fall entsteht meist schon nach 48 Stunden ein deutlicher Schleimwall, der aber bei dicht aneinanderstehenden Kolonien fehlen oder nur rudimentär ausgebildet sein kann.
5. Es schloß sich im Untersuchungsgang die Gramfärbung an.
6. Die Beweglichkeit wurde zuerst im hängenden Tropfen, später nochmals im SIM-Nährboden geprüft.
7. Zur ersten Orientierung über das biochemische Verhalten wurde Kligleragar beimpft. Die Reaktionen wurden nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37° C abgelesen.
8. Der Vergärungstyp wurde mit der bunten Reihe festgestellt. Um ein Verdunsten des Röhrcheninhaltes zu vermeiden, wurden die Stopfen paraffiniert. Bei täglicher Ablesung wurden die Nährböden bei 37° C bebrütet. Die Zuckervergärung wurde durch Umschlag des Indikators sichtbar.

9. Indolbildung: Viele Bakterien können beim Eiweißabbau Indol aus der Aminosäure Tryptophan abspalten. Die Indolbildung wurde chemisch geprüft. Nach eintägiger Bebrütung wurden dem Kulturröhrchen 10 Tropfen Paradimethylaminobenzaldehyd (EHRlich's Reagenz) zugefügt. Im positiven Falle tritt sofort eine kirschrote Färbung auf.

10. Gelatineverflüssigung: Durch Bakterien, die ein zu den Proteasen gehörendes Ferment absondern, kann Gelatine verdaut werden. Um die zu untersuchenden Stämme auf diese Eigenschaft zu prüfen, wurden Röhrchen mit Nährgelatine durch Stich mittels Nadel beimpft. Nach zweitägiger Bebrütung bei 37°C wurden sie in den Kühlschrank gestellt und beobachtet, ob die Gelatine wieder erstarrte oder flüssig blieb.

11. KNO_3 -Reaktion: Denitrifikationsnachweis von $\text{KNO}_3 \rightarrow \text{KNO}_2$.
 $\text{KNO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{O}_2$. Mit 1 Tropfen Diphenylamin- H_2SO_4 -Reagenz (1 Kristall Diphenylamin in 1 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 gelöst), wurde die Anwesenheit von Nitrat untersucht. Ist kein Nitrat vorhanden, so bleibt eine Blaufärbung aus.

12. VOGES-PROSKAUER-Reaktion: Hierbei wird Acetyl-methylcarbinol nachgewiesen, das als Zwischenprodukt beim Kohlenhydratabbau entsteht. Zum Nachweis wurde der Kultur eine Messerspitze Kreatin und 5 ccm 40 %ige NaOH zugefügt, danach 2 - 5 Minuten geschüttelt. Eine positive Reaktion wird durch Rosafärbung ohne Fluoreszenz innerhalb von 2 Minuten angezeigt (mod. nach O'MEARA).

13. Methylrotreaktion: Die Differenzierung der Angehörigen der Coli-Aerogenes-Gruppe wurde in Traubenzuckerpeptonlösung nach 3tägiger Bebrütung ausgeführt. Bei Zusatz von 3 - 5 Tropfen einer 0,04 %igen Methylrotlösung tritt im positiven Fall Rotfärbung auf.

14. Der SIM-Nährboden von DIFCO gestattet eine gleichzeitige Prüfung der Schwefelwasserstoffbildung, der Indolbildung und der Beweglichkeit der in den Nährboden eingebrachten Bakterien. Das Vorhandensein von H_2S wird durch die Schwarzfärbung des Nährbodens (Bildung von FeS) angezeigt. Die Beweglichkeit ist an dem Durchschwärmen der Bakterien durch die Agarsäule zu erkennen. Zur Prüfung der Indolbildung wurde der Nährboden zunächst mit 2 ml Chloroform, darüber sofort mit 2 ml KOVACS Reagenz überschichtet. Eine rosa bis tiefrote Farbe bildet sich bei Anwesenheit von Indol in der Chloroformschicht aus (DIFCO Manual).

15. Harnstoffspaltung: Zahlreiche Bakterienarten spalten mittels des Fermentes Urease Harnstoff. Der bei dieser Reaktion entstehende Ammoniak ist bei Zusatz

einiger Tropfen Phenolphthaleinlösung als Indikator an der pH-Verschiebung ins stark Alkalische erkenntlich.

16. Prüfung der Decarboxylierung von Aminosäuren durch Enterobacteriaceae: Die von der Firma DIFCO hergestellten Nährböden in Röhrchen mit Schraubdeckelverschluß wurden nach Beimpfen 4 Tage lang bei 37° C bebrütet. Durch Spaltung der im Nährmedium enthaltenen Dextrose schlägt der Indikator (Brom-Cresol-Purpur) zuerst von dunkel lila (alkalisch) nach gelb (sauer) um. Eine danach eventuell erfolgte Spaltung der Aminosäuren läßt sich an dem erneuten Umschlag des Indikators ins Alkalische erkennen. Eine Richtlinie für die Auswertung der Ergebnisse gibt folgende Tabelle:

TABELLE I: Aminosäure-Test

	Lysin	Arginin	Ornithin
Arizonagruppe	+	(+)	+
Bethesda - Ballerupgruppe	-		
Salmonellagruppe			
S. typhi	+	-	-
S. para A	-	-(+)	+
S. gallinarum	+	-	-
andere Typen	+	(+)	+
E. coli	±	±	±

17. KCN-Test: Hierbei wird die KCN-Empfindlichkeit des bakteriellen Atmungssystems geprüft. Das Ergebnis zeigt eine noch größere Verlässlichkeit als das der VOGES-PROSKAUER- und der Methylrotreaktion. Zuerst wurde 1 Tropfen einer beimpften Bouillon gegeben und 3 Tage lang bei 37° C bebrütet. Bakterienwachstum ist durch Trübung des Röhrcheninhaltes festzustellen. Zur Kontrolle wurden Röhrchen mit demselben Nährsubstrat, bei dem das KCN fehlte, auf dieselbe Weise beimpft.

Um die Reinheit der einzelnen Kulturen zu prüfen, wurden bei allen Versuchen aus den Röhrchen Proben entnommen und auf Blutagar ausgestrichen. Die so gezüchteten Kulturen wurden als Reinkulturen angesehen.

18. Zur Klärung der Antigenstruktur wurde die Objektträgeragglutination gewählt. Der Agglutination im Serum wurde zur Erkennung der Rauformen eine Prüfung in 3,5 %iger NaCl-Lösung vorausgestellt. Ausführung: Ein großer Tropfen Immunserum bez. NaCl-Lösung wurde mit der Öse auf den Objektträger gebracht. Eine Nadelspitze des zu prüfenden Stammes wurde langsam und gleichmäßig mit der Nadel in den Tropfen eingerieben und durch Hin- und Herkippen der Objektträger bewegt. Gegen das Licht gehalten ist Agglutination an der makroskopisch sichtbaren Zusammenballung zu erkennen.

III. ERGEBNISSE

A) Blutagar: Als Ergebnis der Wachstumsprüfung auf Blutagar kann festgehalten werden, daß die 4 Stämme der Patientin L. (190 L., 54700 gm, 54700 d und 54700 Para-B) morphologisch rauh erschienen, während es sich bei den Stämmen 338, 3979 und 394 um Glattformen handelt (Tabelle 2).

TABELLE 2: Wuchsformen auf Blutagar

Stamm	Form	Farbe	Ø (mm)	Begren- zung	Ober- fläche	Hämo- lyse
190 L.	schwach erhaben	grau	1	unscharf	rauh, matt	keine
54700 gm	schwach erhaben	grau	2	unscharf	rauh, matt	keine
54700 Para-B	flach	grau	2	unscharf	rauh, matt	keine
54700 d	schwach erhaben	grau	1	unscharf	rauh, matt	keine
338	erhaben	grau	1	scharf	spiegelnd glatt	keine
3979	erhaben	grau	1	scharf	spiegelnd glatt	keine
394	schwach erhaben	grau	1	scharf	spiegelnd glatt	keine

B) Endoagar: Tabelle 3 ergibt, daß im Gegensatz zum Wachstum auf Blutagar der Stamm 190 L. auf Endoagar zwar eine unscharfe Begrenzung, aber eine glatte Oberfläche aufwies, während die Wuchsform der restlichen Stämme der auf Blutagar entsprach.

TABELLE 3: Wuchsformen auf Endoagar

Stamm	Form	Durchsichtigkeit	Ø (mm)	Begrenzung	Oberfläche	Lactose-spaltung
190 L.	schwach erhaben	milchig getrübt	2	unscharf	glatt	keine
54700 gm	flach	durchs.	3	unscharf	rauh	keine
54700 Para-B	flach	durchs.	3	unscharf	rauh	keine
54700 d	flach	durchs.	2	unscharf	rauh	keine
338	erhaben	im Zentrum undurchs.	1	scharf	glatt	keine
3979	erhaben	durchs.	1	scharf	glatt	keine
394	kegelförmig	im Zentrum undurchs.	2	scharf	glatt	keine

C) Verhalten der Stämme in Bouillon:

190 L.	diffuse Trübung
54700 gm	klarer Überstand mit Bodensatz
54700 d	leicht getrühter Überstand, Bodensatz
54700 Para-B	klarer Überstand mit Bodensatz
338	diffuse Trübung
3979	diffuse Trübung
394	diffuse Trübung

D) Die Prüfung der Schleimwallbildung zeigte bei Stamm 338, 3979 und 394 ein negatives, bei Stamm 190 L., 54700 gm, 54700 d und 54700 Para-B auf Blutagar und Endoagar ein positives Resultat, das auf Nähragar besonders stark ausgeprägt war.

E) Sowohl Ausstriche von Blutagar, als auch von Bouillon, die mit der Gramfärbung gefärbt wurden, ließen erkennen, daß es sich bei allen Stämmen ausnahmslos um gramnegative, plumpe bis kokkoide Stäbchen handelt, die keine Sporen bilden.

F) Beweglichkeit konnte im hängenden Tropfen nur bei den Stämmen 338, 3979, 394 und 54700 d festgestellt werden. Das Ergebnis der Beweglichkeit im SIM-Nährboden wird bei N) besprochen.

Die Tatsache, daß ein Stamm meist nur durch mehrere biochemische Reaktionen bestimmt werden kann, bringt es mit sich, daß zur Prüfung der Eigenschaften verschiedene Methoden angewandt wurden. Das Mosaik der Ergebnisse soll dann zu einer genauen Diagnose verhelfen.

G) Die Vergärungsbilder der einzelnen Stämme im Kligler'schen Eisenagar sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

TABELLE 4: Reaktionsbild im Kligler'schen Eisenagar

Stamm	Schrägfläche	Stich	Gas	H ₂ S
190 L.	rot	gelb	+	tief-schwarz
54700 gm	rot	gelb	+	schwarzer Ring
54700 Para-B	rot	gelb	+	tief-schwarz
54700 d	rot	gelb	+	schwarzer Ring
338	rot	gelb	+	tief-schwarz
3979	rot	gelb	+	schwarzer Ring

Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß die Stämme 190 L., 54700 Para-B und 338 das typische Reaktionsbild von Salmonellen zeigen. Bei den übrigen Stämmen trat die H_2S -Bildung nur ringförmig auf, wie es typischerweise nur bei *Salmonella typhi* beobachtet wird. Gegen die Diagnose *Salmonella typhi* spricht jedoch die Gasbildung aus Dextrose. Berücksichtigt man, daß in der Literatur *Salmonella*-stämme beschrieben sind (WUNDT 1957), die als atypisches Merkmal H_2S nur ringförmig bilden, so sprechen die im Kligler'schen Eisenagar beobachteten Reaktionsbilder nicht gegen eine Einordnung der geprüften Stämme in die Gattung *Salmonella*.

H) Die Ergebnisse der bunten Reihe und der übrigen biochemischen Proben sind in den Tabellen 5 - 9 festgehalten. Alle Stämme vergären Dextrose prompt. Adonit wird von keinem der Stämme nach 28tägiger Bebrütung angegriffen. Nur Stamm 3979 ist fähig, Lactose, wenn auch verzögert, zu assimilieren und Saccharose sofort zu spalten. Damit unterscheidet er sich wesentlich in seiner Kohlenhydratfermentation von Stamm 338 und ebenso von den anderen Typen. Die vier Stämme der Patientin L. verhalten sich im Hinblick auf die Zuckervergärung identisch. Unterschiede sind nur bezüglich des Zeitpunktes der Vergärung bei den Kohlenhydraten Trehalose und Cellobiose zu finden.

Im Gegensatz zu den Stämmen 338, 3979 und 394, die Ammon-Rhamnose bereits am zweiten Tag deutlich gespalten haben, trat bei den Stämmen 190 L., 54700 gm, 54700 d und 54700 Para B eine eindeutig positive Reaktion am vierten Tag auf, d.h. sie verhalten sich Rhamnose gegenüber ammonstark.

I) Indolbildung konnte bei keinem der Stämme nachgewiesen werden, weder bei der Züchtung in Trypsinbrühe und Prüfung durch Ehrlich's Reagenz, noch im SIM-Nährboden mit Hilfe des Nachweises von Kovacs.

TABELLE 5: Vergärung von Kohlenhydraten

	190 L.	54700 gm	54700 Para -B	54700 d	338	3979	394
	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28
Adonit	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28
Dulcit	+	+	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	-28	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28
Inosit	+	+	+	+	+	-28	-28
Lactose	-28	-28	-28	-28	-28	5	-28
Saccharose	-28	-28	-28	-28	-28	+	-28
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	6	5	4	2	1	1	1
Cellobiose	6	9	7	6	4	5	5
Raffinose	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28
Inulin	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28
Dextrin	-28	-28	-28	-28	-28	-28	-28

TABELLE 6: Verschiedene Stoffwechselleistungen, Beweglichkeit

	190 L	54700 gm	54700 Para-B	54700 d	338	3979	394
Indol, Gelatine	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶	<u>-</u> ⁶
KNO ₃ -Test	-	-	-	-	-	-	-
VOGES-PROSKAUER, Harnstoff	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³
Methylrot	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²	<u>+</u> ²
SIM (Indol)	<u>+</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³	<u>-</u> ³
SIM (Bewegl.)	<u>(+)</u> ⁶	<u>(+)</u> ⁶	<u>(+)</u> ⁶	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ⁶	<u>+</u> ¹
SIM (H ₂ S)	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹	<u>+</u> ¹

TABELLE 7: Aminosäure-Test; Ablesung am 2. Tag

Stamm	Lysin	Arginin	Ornithin
190 L.	+	-	+
54700 gm	+	-	+
54700 Para-B	+	-	+
54700 d	+	-	+
338	+	-	+
3979	-	-	-
394	+	-	+

TABELLE 8: Verhalten der Aminosäure Arginin
am 2. - 4. Tag. Gelb - , lila + .

Stamm	2. Tag	3. Tag	4. Tag
190 L	zart lila	lila	lila
54700 gm	lila	lila	lila
54700 Para -B	gelb	zart lila	lila
54700 d	gelb	gelb	lila
338	gelb	flieder- farben	lila
3979	gelb	zart lila	lila
394	lila	lila	lila

TABELLE 9: Verhalten beim KCN-Test

Stamm	mit KCN	ohne KCN
190 L.	unbewachsen	bewachsen
54700 gm	unbewachsen	bewachsen
54700 Para -B	unbewachsen	bewachsen
54700 d	unbewachsen	bewachsen
338	unbewachsen	bewachsen
3979	bewachsen	bewachsen
394	unbewachsen	bewachsen
Proteus	bewachsen	bewachsen
S. Para -B	unbewachsen	bewachsen
S. typhi	unbewachsen	bewachsen

TABELLE 10 a: Objektträgeragglutination

	NaCl	polyval. Serum	IV	VII	O-Faktoren VIII VI VI, VII IX			
Stamm 190 L	+							
Stamm 54700 gm	+							
Stamm 54700 Para-B	+							
Stamm 54700 d	+							
Stamm 338	Ø	+	Ø	Ø	+	+	+	Ø
Stamm 3979	Ø	Ø						
Stamm 394	Ø	+	Ø	Ø	+	+	+	Ø

TABELLE 10 b - g

b) Objektträgeragglutination in H-Seren:

	HA	HB	HC	HD
Stamm 338	Ø	Ø	Ø	+
Stamm 394	Ø	+	Ø	Ø

c) nach Züchtung auf Schwärmagar ohne Serum:

	"d"	e, h	"h"	"2"	"5"	"6"	"7"
Stamm 338	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø
Stamm 394	Ø	+	+	+	Ø	Ø	Ø

d) nach Züchtung des Stammes 338 auf Gard-Platten mit 1, 2-Serum:

HA	HB	HC	HD	a	b	c	"d"	"i"	z ₁₀	z ₁₄	"2"
+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø

e) nach Züchtung des Stammes 338 auf Gard-Platten mit d-Serum:

HA	HB	HC	HD	"2"	"5"	6	7	z ₆	"d"
Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

f) nach Züchtung des Stammes 394 auf Gard-Platten mit e,h-Serum:

HA	HB	HC	HD	"2"	"5"	6	7	z ₆	e, h
Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

g) nach Züchtung des Stammes 394 auf Gard-Platten mit 1,2-Serum:

HA	HB	HC	HD	e, h	"h"	e, h, x	g, m	1, 2
Ø	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø

K) Sämtliche beimpften Gelatineröhrchen zeigten nach 28-tägiger Bebrütung dieselbe Reaktion wie das unbeimpfte Kontrollröhrchen, d.h., nach Einstellen in den Kühlschrank erstarrte die durch Wärme verflüssigte Gelatine wieder.

L) In keinem Fall konnte das ursprünglich im Nährboden vorhandene Kaliumnitrat mehr nachgewiesen werden, es war zu Kaliumnitrit reduziert worden.

M) Keiner der geprüften Stämme zeigte das bei der Zerlegung der Zucker als Zwischenprodukt entstehende Acethylmethylcarbinol, das durch die Voges-Proskauer-Reaktion nachgewiesen wird.

N) Die positive Methylrotreaktion aller Stämme stellte erneut die Fähigkeit, Dextrose zu spalten, unter Beweis.

O) SIM-Nährboden: H₂S-Bildung im SIM-Nährboden konnte ausnahmslos festgestellt werden. Der negative Ausfall der Indolbildung wurde bereits erwähnt.

Die Stämme 54700 d, 338 und 394 ließen schon nach einem Tag im SIM-Nährboden ein deutliches Ausschwärmen erkennen, Stamm 3979 wurde am 4. Tag beweglich, bei den Stämmen 190 L. und 54700 gm trat erst am 6. Tag eine minimale Beweglichkeit ein. Demzufolge wurden diese vier letztgenannten Stämme auf U-Röhrkölbchen nach BADER, gebracht. Die zuerst am freien Ende des U-förmig gebogenen Röhrchens angekommenen Bakterien haben die beste Geisselausbildung. Daher wird von diesem nichtbeimpften, nur durch schwärmendes Wachstum zu erreichenden Teil des Nährbodens abgeimpft und auf U-Röhrchen übertragen. Auch die zuerst nur geringgradig schwärmenden Keime zeigten nach dieser zwischengeschalteten Passage Beweglichkeit. Daraus ergibt sich, daß jeder der Stämme die Fähigkeit zur Ausbildung von Geisseln hat.

P) Die Harnstoffprobe (siehe Tabelle 6) fiel bis zum 3. Tag gleichmäßig negativ aus, erst am 4. Tag war in einigen Fällen der Umschlag in den basischen Bereich zu erkennen. Für diese Alkalisierung ist jedoch nicht ein verzögertes Reagieren des Fermentes Urease verantwortlich zu machen, sondern die beim Abbau der Peptone abgespaltenen stickstoffhaltigen Gruppen.

Q) Nach Tabelle 7 und 8 spricht das Verhalten der 4 Stämme der Patientin L. gegenüber Aminosäuren für die Zugehörigkeit zur Gattung *Salmonella*. Die verzögerte Argininspaltung macht eine Unterscheidung von *E. coli* möglich. Stamm 338 verhält sich gleichermaßen typisch für *Salmonella*. Da Stamm 3979 Lysin und Ornithin nicht angreift, Arginin jedoch verzögert decarboxyliert wird, im Gegensatz zu *E. coli*, bleibt nur noch die Bethesda-Ballerupgruppe.

R) Die Ergebnisse des KCN-Testes sind in Tabelle 9 dargelegt. Sie zeigen mit Ausnahme von Stamm 3979 einen deutlichen Unterschied im Wachstum der Kulturen in den Röhrchen mit KCN zu denen ohne KCN. Diese Nährmedien sind durch diffuse Bakterienvermehrung getrübt, ebenso wie das zur Kontrolle mit *Bact. Proteus* beimpfte, in der Nährflüssigkeit KCN enthaltende Röhrchen. Jene lassen eine klare Flüssigkeit erkennen, welche für Hemmung des Bakterienwachstums spricht. Die zur Kontrolle mit *S. paratyphi B* und *S. typhi* beimpften Röhrchen zeigen wachstumshemmendes Verhalten. Stamm 3979 ist als einziger der zu prüfenden Stämme nicht KCN-empfindlich. Dieses Ergebnis läßt ihn erneut aus der Gattung *Salmonella* ausschließen.

Da eine exakte Differenzierung in der Gattung *Salmonella* durch die biochemische Untersuchung allein nicht möglich ist, wurde zur Klärung des Typs die Serologie zu Rate gezogen.

S) Die zur Prüfung serologisch rauher Formen vorgenommene Objektträgeragglutination in 3,5 %iger NaCl-Lösung ergab Spontanagglutination bei den Stämmen 190 L., 54700 d, 54700 gm und 54700 Para-B. Dadurch war eine serologische Bestimmung dieser Stämme mittels der angeführten Methode unmöglich gemacht. Von den drei serologisch glatt reagierenden Stämmen konnten, wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, durch Prüfung in polyvalentem Serum die Stämme 338 und 394 serologisch der *Salmonella*-Gruppe zugeordnet werden. Mittels Einfaktorenseren ließen sich für beide Stämme die gleichen O-Antigene VI, VIII bestimmen. Eine Geisselagglutination in polyvalenten Seren war erst nach Züchtung auf Schwärmplatten möglich. Beide Stämme lagen nur in der spezifischen Phase vor. So wurden, um die unspezifische Phase zu erzwingen, Gard-Platten mit Zusatz von Serum der spezifischen H-Phase des jeweiligen Stammes zu Hilfe genommen. Es konnte dadurch, gemäß dem KAUFFMANN-WHITE-Schema, für Stamm 338 die serologische Diagnose *S. muenchen* VI, VIII; d, 1,2 und für Stamm 394 *S. newport* VI, VIII; e,h, 1,2 gestellt werden.

Bei einer späteren Prüfung der vier serologischen Rauhestämme fiel bei Stamm 54700 d eine Kolonie besonders auf, die morphologisch den Eindruck einer Glattform erweckte. Untersuchungen in 3,5 %iger NaCl-Lösung ließ Spontanagglutination vermissen. Der anschließende Agglutinationsversuch in polyvalen-

tem Serum war positiv. Mittels Einfaktorensereen ließen sich dann für Stamm 54700 d die Faktoren IV und V als O-Antigene bestimmen. Eine Bestimmung der Geisselantigene war jedoch nicht mehr möglich, da der Stamm auf Schwärmplatten keine Geisseln bildete und bereits nach der Überimpfung wieder in Rauforn vorlag (Prüfung der O-Antigene siehe Tabelle 11).

TABELLE 11: Prüfung der O-Antigene von Stamm 54700 d

NaCl	polyval. Serum	IV	V	IX	VI, VII	VI, VIII	XXVII
Ø	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø

IV. DISKUSSION

Die Fülle der Ergebnisse soll nun in Einklang gebracht und für jeden Stamm die entsprechende Diagnose gestellt werden.

A) Stämme der Patientin L. (190 L. 54700 gm, 54700 d und 54700 Para-B):

Die serologische Prüfung mittels Objektträgeragglutination konnte zunächst nur wenig zur Klärung beitragen, da alle vier Stämme bei der Untersuchung als Rauhestämme vorlagen, d.h., sie zeigten Spontanagglutination in NaCl-Lösung. Es wurde versucht, durch Züchtung der Stämme auf verschiedenen Nährmedien, wie Endoplatte und Agarplatte, und durch Änderung der Temperatur einen Rückschlag in die Glattform zu erreichen. Jedoch blieb dieser Versuch ohne sicheren Erfolg. Zwar kam es öfter zur Ausbildung von Kolonien, die morphologisch den Eindruck einer Glattform erweckten, die aber in NaCl-Lösung sich spontan zusammenballten. Diese Erscheinung ist häufig in der Literatur beschrieben (SCHOLTENS 1937, BADER 1949, SCHLOSSHARDT 1964). Sie beweist, daß morphologisch rauh nicht gleich serologisch rauh sein muß und umgekehrt. "Durch die in den meisten Fällen vorhandene Parallelität zwischen dem Aussehen der Kolonien, der Spontanagglutinabilität und der Veränderung der Antigenstruktur, verschob sich der ursprünglich morphologisch definierte Begriff der Rauheit immer mehr nach der serologischen Seite" (BADER 1949). Um Mißverständnisse auszuschließen, schlug KRÖGER (1955) eine neue Nomenklatur vor, welche die morphologische und serologische Form getrennt berücksichtigt. Demnach handelte es sich bei den vorliegenden Stämmen um R Ω -Formen (äußerlich rauh, mit reduziertem O-Antigengehalt), die fähig waren, S Ω -Formen (äußerlich glatt mit reduziertem O-Antigengehalt) und So-Formen (äußerlich glatt, O-frei) abzuspalten. Erst bei einer erneuten Prüfung, nachdem die Keime auf Schrägagar in paraffinierten Kulturröhrchen ungefähr ein halbes Jahr bei Zimmertemperatur gestanden hatten, konnte bei Stamm 54700 d nach Aussäen auf Blutagarplatten eine SO-Kolonie festgestellt werden, eine Form mit komplettem O-Antigengehalt. Mit Hilfe der Objektträgeragglutination wurden die Antigene IV und V eruiert. Die bei der biochemischen Untersuchung durch U-Rohrkölbchen und U-Röhrchenpassage gewonnene Beweglichkeit war inzwischen wieder verloren gegangen. Auf Schwärmagar konnte keine Geißelausbildung mehr erreicht werden. Bei erneuter Kontrolle in NaCl-Lösung zeigte

sich, daß der Stamm bereits wieder in die serologische Rauform umgeschlagen war.

Stamm 54700 d ist somit gemäß seiner O-Antigene zur B-Gruppe des KAUFF-MANN-WHITE-Schemas zu rechnen. Die beiden Stämme 54700 gm und 54700 Para-B, die durchweg Spontanagglutination zeigten, scheinen irreversible Rauformen zu sein, wie sie SCHLOSSHARDT (1964) beschrieb. Nach KRÖGER können sie als Ro-Formen bezeichnet werden.

So muß sich die Diagnose des Stammes 54700 d zum Teil und die der drei restlichen Raustämme ausschließlich auf morphologische, färberische und kulturell-biochemische Ergebnisse stützen.

Die Gramfärbung ergab, daß es sich ausnahmslos um gramnegative Stäbchen handelt, die keine Sporen bilden. Bei den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen lag kein Kriterium vor, das den Ausschluß der Stämme 190 L., 54700 gm, 54700 Para-B und 54700 d aus der Salmonellagruppe forderte. Sie spalteten Lactose, Saccharose und Salizin nicht, bildeten kein Indol und verflüssigten Gelatine nicht. Dagegen wiesen sie die typischen Stoffwechselleistungen von Salmonellen auf. Nur die H_2S -Bildung zeigte bei den Stämmen 54700 gm und 54700 d insofern eine Besonderheit, als sie im Kligleragar eine ringförmige Schwärzung des Nährbodens verursachten, wie dies unter anderem für *Salmonella typhi* typisch ist. Diese Abweichung ist jedoch belanglos.

Zieht man in Betracht, daß Stamm 54700 d mit Hilfe der Objektträgeragglutination in die Salmonella B-Gruppe eingeordnet werden konnte, so läßt sich für diesen Stamm die Zahl der in Frage kommenden Typen wesentlich einengen. In Verbindung mit der Schleimwallbildung ist besonders an das Vorliegen von *Salmonella paratyphi* B zu denken. Es muß nun geprüft werden, ob die übrigen Stoffwechselleistungen sich mit der Diagnose *Salmonella paratyphi* B vereinbaren lassen. Die ringförmige H_2S -Bildung des Stammes 54700 d hatte ursprünglich den Verdacht auf *Salmonella typhi* gelenkt, doch kann diese Spezies wegen der eindeutigen Gasbildung mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei anderen Salmonellatypen kommt die ringförmige H_2S -Bildung als typische Reaktion nicht vor, doch gelegentlich bei Varianten, die H_2S spät oder unregelmäßig bilden. Das atypische Verhalten des Stammes 54700 d läßt sich deshalb weder im positiven noch im negativen Sinne bewerten.

Von einer gewissen Bedeutung ist ferner das Resultat der Vergärung bestimmter Kohlenhydrate in den Ammonnährböden. Alle Stämme waren am vierten Tag ammonstark. Erfahrungsgemäß verhalten sich Stämme von *Salmonella paratyphi* B in der Ammonreihe nicht einheitlich. Es kann jedoch damit gerechnet werden, daß in der Regel Dextrose, Arabinose, Dulcitol und Citrat verwertet werden, nicht

dagegen Rhamnose. Bei dem letztgenannten Kohlenhydrat ergibt sich insofern ein unterschiedliches Verhalten des Stammes 54700 d gegenüber *Salmonella paratyphi* B, als er auch Rhamnose spaltete. Die Diagnose *Salmonella paratyphi* B wird deshalb durch den Ausfall der Ammonreihe nicht bestätigt.

Schließlich mußte geprüft werden, wie sich der Stamm 54700 d im Aminosäuretest verhielt. Es ergab sich, daß *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A und *Salmonella gallinarum* ausgeschlossen werden können, daß die erzielten Reaktionen indessen nicht gegen *Salmonella paratyphi* B sprechen.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so kommt man zu dem Schluß, daß der Stamm 54700 d nicht eindeutig eingeordnet werden kann. Fest steht nur, daß er der *Salmonella* B-Gruppe zugehört. Billigt man der Schleimwallbildung als morphologischem Merkmal eine gewisse Priorität zu, so kommt man, ohne daß dem der Ausfall der Decarboxylasereaktionen widerspricht, zu der Diagnose *Salmonella paratyphi* B. Dabei muß allerdings in Kauf genommen werden, daß der Ausfall der H_2S -Reaktion und der Kohlenhydratvergärung in der Ammonreihe nicht typisch ist. Gibt man diesen physiologischen Gesichtspunkten den Vorrang, so kann es sich um jeden Inosit vergärenden Stamm der B-Gruppe handeln, wobei allerdings die Schleimwallbildung als atypisch angesehen werden muß.

Die Stämme 190 L., 54700 gm und 54700 Para-B konnten serologisch nicht bestimmt werden. Sie verhielten sich biochemisch aber praktisch wie Stamm 54700 d. Dies spricht, ohne daß es bewiesen werden kann dafür, daß diese Stämme Rauhvarianten des Stammes 54700 d sind.

B) Von den beiden aus den Dejekten der erkrankten Ärztin gezüchteten Stämme, 338 und 3979, erwies sich der eine, 338, auf Grund der morphologischen, biochemischen und serologischen Prüfung als *Salmonella muenchen* (VI, VIII; d, 1, 2), doch entsprach er hinsichtlich der Xylosevergärung nicht der Norm. Dieses Kohlenhydrat wurde selbst nach 28tägiger Bebrütung nicht angegriffen. Eine solche geringfügige Abweichung kann hingegen an der gestellten Diagnose nichts ändern. Nach KAUFFMANN (1936) muß mit weitgehender Konstanz der Vergärungstypen gerechnet werden, "sodaß wir allmähliche oder sprunghafte Änderung des Vergärungstypus nur als seltene Ausnahme betrachten, welche die allgemeine Regel bestätigen." Der atypische Ausfall der Xylosevergärung ändert deshalb an der gestellten Diagnose nichts.

Der zweite Stamm, 3979, im mikroskopischen Präparat ein gramnegatives Stäbchenbakterium, verhielt sich auf dem Endonährboden wie ein Angehöriger der Gattung *Salmonella*, d.h., er spaltete Lactose nicht. Auf dem Kligler'schen Eisenagar wurde Lactose ebenfalls nicht angegriffen, Dextrose wurde dagegen unter Gasbildung gespalten und H_2S reichlich gebildet. Die anschließen-

de Prüfung der Lactosevergärung in Kohlenhydratbouillon ergab dagegen einen Angriff auf dieses Kohlenhydrat am fünften Tag. Dieses Verhalten spricht jedoch nicht unbedingt gegen die Zugehörigkeit zur Salmonellagruppe, da Enteritiserreger, wie z.B. *Salmonella anatum*, bekannt sind, die lactosepositive Varianten abspalten (KAUFFMANN 1937). Hinzu kam, daß der Stamm, am vierten Tag abgelesen, ammonstark war. Sein Verhalten gegenüber den Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin war dagegen atypisch. Da es sich bei dem gezüchteten Stamm um eine Glattform handelte, mußte der Schwerpunkt der Diagnostik auf die serologische Prüfung verlegt werden. Im polyvalenten O-Serum ergab sich jedoch keine positive Reaktion, sodaß die Zugehörigkeit zur Salmonellagruppe ausgeschlossen werden konnte. Auf Grund des gesamten biochemischen Verhaltens, des KCN-Tests und insbesondere auch im Hinblick auf die positive Ammoncitratreaktion kann er in die Gattung *Citrobacter* eingereiht werden, die Angehörige der Spezies *E. freundii* und der Bethesda-Ballerupgruppe umfaßt.

C) Stamm 394 war ursprünglich aufgefallen, weil er sich auf dem Kligler'schen Eisenagar wie *Salmonella typhi* verhalten hatte. Milchzucker vergor er nicht, aber Dextrose ohne Gasbildung, und zeigte ringförmig H_2S an der Übergangsstelle zwischen Hochschichtagar und Schrägagar. Die Kohlenhydratvergärung sprach bei der weiteren Prüfung nicht gegen die Zugehörigkeit zur Salmonellagruppe, ebenso wenig das Verhalten gegenüber den Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin. Außerdem erwies er sich als ammonstark. Der KCN-Test war negativ. Auch die übrigen Stoffwechselleistungen machten eine Eingliederung in die Salmonellagruppe möglich. Wie bei Stamm 338 mußte auch hier die serologische Prüfung die Entscheidung bringen. Bei der Objektträgeragglutination reagierte er in den O-Seren der Gruppen A, B, D und E negativ, in O-Seren der C-Gruppe aber positiv. Auf Grund einer positiven Agglutination in einem Einfaktorenserum VIII ließ er sich in die Gruppe C₂ einordnen. Die Bestimmung der H-Antigene ergab eine Reaktion in e,h-Serum und in einem abgesättigten h-Serum. Die auf der Gardplatte nach Zugabe von e,h-Serum erzwungene zweite Phase erwies sich nach positiver Agglutination in einem abgesättigten Serum "2" als 1,2-Phase. Damit stand eindeutig die Diagnose *Salmonella newport* fest. Der Stamm verhielt sich jedoch insoweit abweichend, als er die eingangserwähnten Besonderheiten der H_2S -Bildung und der fehlenden Gasbildung aus Dextrose zeigte. Ein ähnliches Phänomen beobachtete WUNDT (1953) bei einem Stamm von *Salmonella paratyphi* B. Bei der Erstzüchtung im Kligler'schen Eisenagar trat keine Schwärzung des Nährbodens auf und erst nach einigen Passagen bildete er H_2S schwach und unregelmäßig und zum Teil auf eine umschriebene Stelle beschränkt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Untersuchung von sieben der Familie Enterobacteriaceae zugehörigen Stämme beschrieben, die bei der Erstzüchtung den Verdacht der Zugehörigkeit zur Salmonellagruppe geweckt hatten, sich aber teils biochemisch, teils serologisch nicht typisch verhielten. Sechs der Stämme konnten als atypische Salmonellen bestimmt werden, bei einem weiteren Stamm handelte es sich um einen Angehörigen der Gattung Citrobacter.

VI. LITERATUR

1. Arkwright, J. A. : Variation of bacteria in relation to agglutination by salt and by spezific serum. J. Path. Bact. 24, 36 (1921).
2. Bader, R. -E. : Die Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe. Ergebn. Hyg. Bact. 26, 235 (1949).
3. Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Baltimore 1957.
4. Borman, K., C.A. Stuart a. M. Wheeler: Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. J. Bact. 48, 351 (1944).
5. Braun, W. : Bacterial dissociation, critical review of a phenomenon of bacterial variation. Bact. Rev. 11, 75 (1947).
6. Difco Manual of dehydrated culture media and reagents to microbiological and clinical laboratory procedures, 9. Ed. Difco Laboratories, Detroit.
7. Gard, S. : Das Schwärmpänomen in der Salmonellagruppe und seine praktische Ausnützung. Z. Hyg. Infekt. -Kr. 120, 615 (1938).
8. Habs, H., u. N. Blau: Untersuchungen über Variationsformen von Paratyphus-B-Bakterien, insbesondere über die Mucosusform. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 128, 441 (1933).
9. Herzberg, M., a. J.H. Green: Composition and characteristics of cell walls of smooth strains of salmonella typhimurium and derived rough variants. J. gen. Microbiol. 35, 421 (1964).
10. Kauffmann, F. : Über die Typeneinteilung der Gärtnergruppe. Z. Hyg. Infekt. -Kr. 117, 431 (1936).
11. Kauffmann, F. : Über eine laktosespaltende Salmonellavariante sowie die Definition der Salmonellagruppe. Z. Hyg. Infekt. -Kr. 119, 352 (1937).
12. Kauffmann, F. : Salmonellaprobleme. Z. Hyg. Infekt.- Kr. 120, 177 (1938).
13. Kauffmann, F. : Die Bakteriologie der Salmonellagruppe. Munksgaard, Kopenhagen 1941.

14. Kauffmann, F.: A new antigen of salmonella paratyphi B and salmonella typhimurium. Acta path. microbiol. scand. 39, 299 (1956).
15. Kristensen, M., u. F. Kauffmann: Untersuchungen über einen indolpositiven Salmonellastamm. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 117, 426 (1936).
16. Kröger, E.: Übersicht über die S/R Variationen bei gramnegativen Darmbakterien. Ergebn. Hyg. Bakt. 29, 475 (1955).
17. Lüderitz, O., F. Kauffmann, H. Stierlin u. O. Westphal: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 179, 180 (1960).
18. Lüderitz, O., A.M. Staub u. O. Westphal: Immunchemistry on O and R antigens of salmonella. Bact. Rev. 30, 192 (1966).
19. Lüderitz, O., u. O. Westphal: Die Bedeutung von Mutanten bei Enterobacteriaceen für die chemische Erforschung ihrer Zellwand-Polysaccharide. Angew. Chem. 78, 172 (1966).
20. v. Prittwitz und Gaffron, J.: Untersuchungen über die Struktur von S und R Formen bei gramnegativen Darmbakterien mit dem Phasenkontrastmikroskop. Arch. Hyg. 136, 218 (1952).
21. Salmon, D.E.: Investigations of swine-plague. A.R. Bur. Anim. Indust. 2, 184 (1885).
22. Schlosshardt, J.: Untersuchungen über die Entstehung von Mutagenen im Zellstoffwechsel und ihre Rolle im S/R-Formenwechsel bei Salmonellen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 192, 54 (1964).
23. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. 2. Aufl., Steinkopff, Darmstadt 1955.
24. Scholtens, R.Th.: Der Glatt-Rauhformenwechsel des Bacterium typhi. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 139, 467 (1937).
25. Shands, J.W.: Localisation of somatic antigen on gramnegative bacteria by elektron microscopy. J. Bact. 90, 266 (1965).
26. Sonnenschein, C.: Atypische Wuchsformen von Bakterien als Krankheitserreger. Mucosusform von Bacterium paratyphi im Blut eines Paratyphuskranken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 100, 11 (1926).
27. Watanabe, Y., Ch.M. Wilson a. L. Wampole: Biochemical variant of salmonella enteritidis which utilizes sucrose. J. Bact. 81, 1007 (1961).

28. Wundt, W. : Über eine kulturelle Variante von *Salmonella paratyphi* B.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 136, 397 (1953).

Aufrichtigen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader für die Überlassung des Dissertationsthemas und insbesondere für seinen mir jederzeit gern gewährten Rat.

Für die Beratung bei der Durchführung der Versuche möchte ich den Assistentinnen des Hygiene-Institutes Tübingen herzlich danken.

Lebenslauf

Am 8. Januar 1941 wurde ich, Gerhild Gschrey, als zweite Tochter des Arbeitsgerichtsdirektors Dr. Hans Gschrey und seiner Ehefrau Helene, geborene Micheler, in München geboren. Vier Jahre lang, von 1947-1951, besuchte ich in Landsberg/Lech die städtische Mädchenvolksschule. Nach neun Jahren Oberschule in Landsberg, Nürnberg und München legte ich im Sommer 1960 am Luisengymnasium in München die Reifeprüfung ab. Das Studium der Medizin begann ich an der Universität München, bestand dort nach dem zweiten Semester die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem fünften Semester das Physikum. Nach dem ersten klinischen Semester wechselte ich zur Universität Tübingen, an der ich am 31. Januar 1967 das medizinische Staatsexamen beendete.

